Aus der chem. Abteilung des physiologischen Institutes
der Universität München
Leiter: Rektor, Prof. Dr. Philipp Broemser

Das Schicksal der Brenztraubensäure

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde in der Zahnheilkunde

verfaßt und einer

Hohen Medizinischen Fakultät der Bayerischen
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Werner Miller
aus Kufstein (Tirol)

München 1939
Universitäts-Buchdruckerei Dr. C. Wolf & Sohn

Aus der chem. Abteilung des physiologischen Institutes
der Universität München
Leiter: Rektor, Prof. Dr. Philipp Broemser

Das Schicksal der Brenztraubensäure

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde in der Zahnheilkunde

verfaßt und einer

Hohen Medizinischen Fakultät der Bayerischen
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Werner Miller
aus Kufstein (Tirol)

München 1939
Universitäts-Buchdruckerei Dr. C. Wolf & Sohn

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Bayer. Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Referent:

Professor *A. Hahn*

Tag der mündlichen Prüfung:

20. Dezember 1939

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

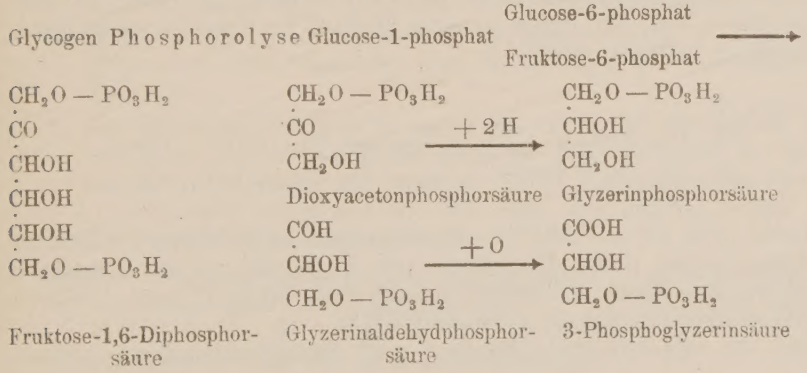
Die Entstehung der Brenztraubensäure im Körper.

Wir unterscheiden zwei Arten des Abbaues von Kohlehydraten in Geweben. Die erste in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff, also unter aeroben Bedingungen. Die zweite unter anaeroben Bedingungen, also in Abwesenheit von Sauerstoff, wie z. B. bei der alkoholischen Gärung. Aehnlich vollzieht sich der Abbau der Kohlehydrate im tierischen Gewebe.

Glucose wird im Körper zunächst wahrscheinlich in Glycogen umgewandelt.[1]) Die Spaltung des Glycogens ist mit einer Phosphorolyse der Bruchstücke desselben verbunden, dabei entsteht das von *Gori*[2]) 1936 entdeckte Glucose-1-phosphat. Dieses wird schnell, wie *Embden, Neuberg, Robinson, Gori, Parnas* und andere in langen Versuchen zeigten, in den „Embden-ester" umgewandelt, ein Gemisch von Glukose-6-phosphat und Fruktose-6-phosphat. Durch weitere Phosphorylierung entsteht das Fruktose-1,6-Diphosphat. Dieses wird in tierischen Geweben in ein Molekül Glyzerinaldehydphosphat und Dioxyaceton aufgespalten. Diese beiden Substanzen sind jedoch im normalen Stoffwechselumsatz nicht nachzuweisen, da sie schnell wieder umgebaut werden. Dioxyacetonphosphat und Glyzerinphosphat stellen die Vorstufen der Milchsäure dar.

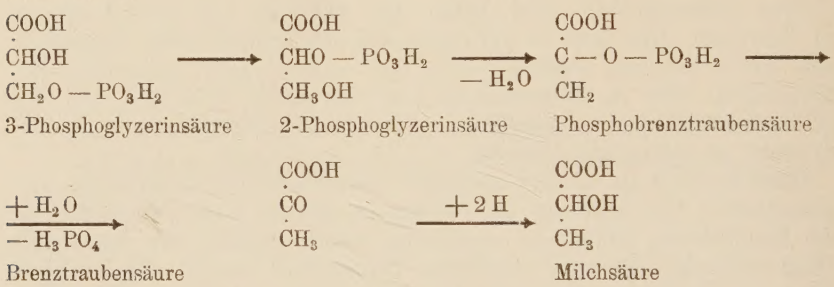
Schema I.

Diesen Reaktionsverlauf konnte *Meyerhof* 1937 belegen.



Wie aus diesem Schema ersichtlich, werden die beiden Körper sehr schnell umgewandelt in Glyzerinphosphosäure und in 3-Phosphoglyzerinsäure. Diese wieder werden in folgender Reaktionsfolge zunächst in Phosphobrenztraubensäure übergeführt und diese schließlich in Milchsäure. *(Embden, Deutike, Jost.)*[3])

Schema II.

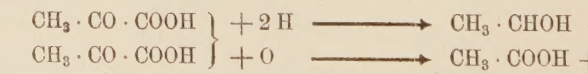


Die so entstandene Brenztraubensäure erleidet nun im tierischen Organismus eine verschiedenartige Umwandlung. Sie ist im Körper für wichtige Reaktionsorganismen von ausschlaggebender Bedeutung.

Reduktion der Brenztraubensäure zu Milchsäure.

Die Reduktion der Brenztraubensäure zu Milchsäure ist mit einer Aufnahme von zwei Wasserstoffatomen verbunden. Sie werden anfangs von der intermediären Glyzerinphosphorsäure geliefert, während später als wichtigster Wasserstoff-Donator die Triosephosphorsäure dient. Auch durch Dismutation der Brenztraubensäure mit einer zweiten α-Ketosäure oder mit einem zweiten Molekül Brenztraubensäure kann Milchsäure gebildet werden.

Schema III.



Dabei wird ein Molekül Brenztraubensäure zu Milchsäure reduziert und das zweite unter Abspaltung von Kohlendioxyd zu Essigsäure oxydiert. Bei dieser Milchsäurebildung sind CO-Dehydrase 1 und 2 als Wasserstoffüberträger notwendig.[4])[5])[6])

Bei der alkoholischen Gärung wird Brenztraubensäure schnell

decarboxyliert und Azetaldehyd gebildet. Dieser übernimmt nun an Stelle der Brenztraubensäure den Wasserstoff der Wasserstoffdonatoren. An Stelle der Milchsäure entsteht dabei Alkohol. Die Erkenntnis, daß Milchsäure durch Reduktion von Brenztraubensäure entsteht, ist neu. Man hatte früher als Vorstufe der Milchsäure Methylglyoxal angesehen. Nach den Ergebnissen der neuesten Arbeiten kommt, wie *Lohmann* 1932 zeigen konnte, dasselbe jedoch nicht in Frage, sondern es geht in unnatürliche l(—)Milchsäure über und nicht in die d(—)Milchsäure. Es muß also demnach die Brenztraubensäure einzig und allein im Körper für die Bildung der Milchsäure verantwortlich gemacht werden.

Dieser eben beschriebene Weg des anaeroben Abbaues der Kohlehydrate wird in jenen Geweben, in denen Milchsäure langsam gebildet wird, begangen, wie im Hirn, glatten Muskeln und auch im Herzmuskel.

Wie aus Schema III ersichtlich, ist demnach die Bildung von Kohlendioxyd auch durch eine anaerobe Reaktion, also durch Dismutation zweier Moleküle Brenztraubensäure möglich, ebenso wie beim aeroben Abbau der Kohlehydrate, der letzten Endes stets zu Kohlendioxyd und Wasser führt.

Es scheint demnach, daß die Hauptmenge der im Organismus gebildeten Kohlensäure auf diese Weise gebildet wird, nämlich durch oxydative Decarboxylierung der Brenztraubensäure oder einer anderen α-Ketosäure.

In sehr eleganten Versuchen konnte *Weil-Malherbe* 1937 darauf hinweisen. Er ließ Hirnschnitte auf Brenztraubensäure und α-Ketoglutarsäure einwirken und dann folgendes:

1. Das Verhältnis der Abnahme der Brenztraubensäure : Milchsäurebildung : freigewordenem Kohlendioxyd = 2 : 1 : 1 in allen Versuchen. Dies weist auf eine Dismutation der Brenztraubensäure hin.
2. Mit Hirnschnitten wurden mehr als 80% der theoretisch berechneten Menge Essigsäure gefunden. Die Ausbeute an Bernsteinsäure ist dabei auf mehr als 60% der oxydierten Brenztraubensäure angewachsen, der Rest auf 100% wurde als β-Oxybuttersäure erkannt.
4. Das Verhältnis Abnahme der Ketoglutarsäure : gebildeter Bernsteinsäure : gebildeter Oxyglutarsäure : freigewordenem CO_2 = 2 : 1 : 1 : 1 in Hirnschnitten und im Hirnbrei und weist auf eine Dismutation der Ketoglutarsäure hin.

Der Beweis für die Bildung von l(—)α-Oxyglutarsäure wurde erbracht a) durch die Bildung einer Substanz, welche durch ein Enzym oxydiert wird unter den für l(—)α-Oxyglutarsäure charakteristischen Bedingungen; b) in der Bildung einer Substanz, deren optische Eigenschaften mit denen der l(—)α-Oxyglutarsäure übereinstimmen; c) durch die Isolierung Zink-Oxyglutarat.

5. Die anaerobe Decarboxylierung von Ketosäuren wird beschleunigt durch Hinzugabe von Brillantkresolblau. Das Verhältnis von reduziertem Farbstoff : freigewordenem $CO_2 = 2 : 1$, dabei wurde die CO_2-Bildung in Abwesenheit des Farbstoffes nicht berücksichtigt.

Daraus ergaben sich für den Forscher folgende bedeutsame Folgerungen:

1. Die Decarboxylierung von Ketosäuren ist ein oxydativer Prozeß.
2. Die Umwandlung von Brenztraubensäure in Bernsteinsäure vollzieht sich über die oxydative Kondensation von zwei Molekülen entstandener Essigsäure. Als Wasserstoffakzeptor für diese Reaktion wurde die Brenztraubensäure erkannt. Sie ist wahrscheinlich in geringen Mengen in den Hirnschnitten wirksam und wird durch die Zerstörung der Zellen frei. α-Ketoglutarsäure ist wahrscheinlich kein Zwischenprodukt in dieser Reaktion.
3. Dismutationen von α-Ketosäuren laufen alle unter streng anaeroben Bedingungen ab. In Anwesenheit von Sauerstoff oder eines Farbstoffes tritt an Stelle der Dismutation Dehydrierung ein.

Bernsteinsäure entsteht auch durch oxydative Decarboxylierung der α-Ketoglutarsäure.

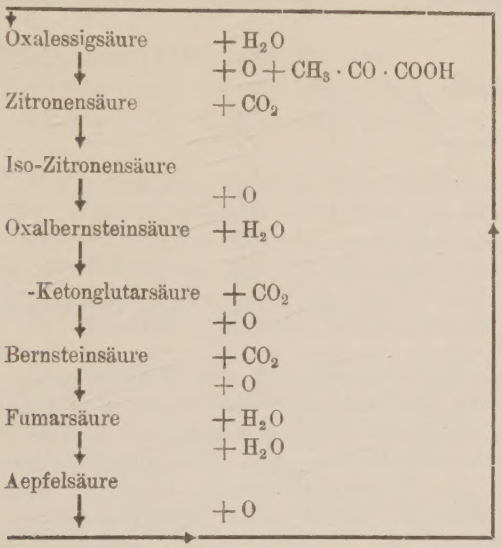
$$COOH \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CO \cdot COOH \longrightarrow CO_2 + COOH \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot COOH$$

Bernsteinsäure wird im Organismus leicht zu Fumarsäure oxydiert, diese in Aepfelsäure umgelagert und weiter zu Oxalessigsäure oxydiert. Für den weiteren Abbau der Oxalessigsäure ist die Tatsache wichtig, daß sich Oxalessigsäure leicht in „vitro“ zu Zitronensäure kondensiert und daß Zitronensäure in der Leber unter Abspaltung von zwei Molekülen Kohlendioxyd über α-Ketoglutarsäure wieder in Bernsteinsäure übergeht. Wie *Knoop* und *Martins*[7]) 1936 nachweisen konnten.

Oxalessigsäure wird auch im lebenden Körper in Zitronensäure umgewandelt und der Kohlehydratabbau durch Zitronensäure katalysiert. Diesen Beobachtungen wird am besten das Schema von

Krebs und *Jonson*[8]) gerecht. Es ist jedoch unsicher, ob dies der Hauptweg des aeroben Kohlehydratabbaues ist, denn Oxalazetate kondensieren sich unter physiologischen Bedingungen nicht mit Brenztraubensäure zu Zitraten und zugesetztes Zitrat wird im tierischen Gewebe schnell zerstört.

Schema IV.



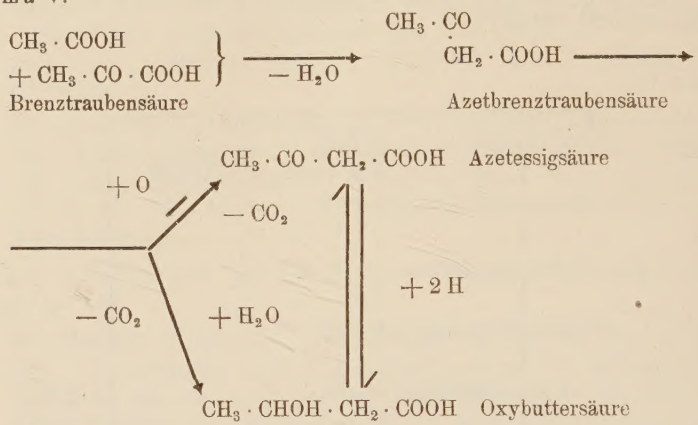
Aus diesem Schema[9]) ist ersichtlich, daß Brenztraubensäure zunächst an Oxalessigsäure angelagert wird und nun im Verband des entstehenden Kondensationsproduktes decarboxyliert wird. Als Oxydationsprodukte treten die zu erwartenden drei Moleküle Kohlendioxyd auf. Oxalessigsäure wird schließlich regeneriert und kann somit immer neue Mengen Brenztraubensäure umsetzen. Die Bruttogleichung lautet folgendermaßen:

$$CH_3 \cdot CO \cdot COOH + 5\,O + H_2O \longrightarrow 3\,CO_2 + 3\,H_2O.$$

Schaltet man das katalytisch wirkende System der C_4-Oxysäuren aus, so wird Brenztraubensäure von Leber und Muskel in Azeton und Azetessigsäure umgewandelt.[10]) Die dabei aus Brenztraubensäure gebildete Essigsäure wird mit einem zweiten Molekül Brenztrauben-

säure zu Azeto-Brenztraubensäure kondensiert. Diese -Ketosäure geht leicht in Azetessigsäure oder β-Oxybuttersäure über.

Schema V.



Dadurch ist bewiesen, daß für das Auftreten von Ketonkörpern in den tierischen Stoffwechselprodukten nicht nur Fett und Eiweiß verantwortlich zu machen sind, sondern auch Kohlehydrate im Wege über die Brenztraubensäure. Die eben beschriebene Reaktion ist spezifisch für die Brenztraubensäure. Dieselbe kann dabei durch Fettsäure, Milchsäure, Alanin oder Bernsteinsäure ersetzt werden. Es steht noch nicht fest, ob dabei primär Azetessigsäure oder β-Oxybuttersäure entsteht. Im Organismus können diese beiden Säuren oxydoreduktiv ineinander übergehen.

Diese letzthin angeführten Schemata belegen, daß der Abbau der Kohlehydrate im tierischen Organismus nicht allein Reaktionen, die unter anaeroben Bedingungen ablaufen, zuzuschreiben sind, sondern daß bis zu einem gewissen Maße auch aerobe Reaktionen beteiligt sind. Inwieweit nun diese Reaktionen am Abbau der Kohlehydrate im tierischen Organismus beteiligt sind, das zu erfahren ist in der letzten Zeit der Gegenstand zahlreicher Versuche geworden.

Die beiden Forscher, *Krebs* und *Jonson*, legen ihre Versuche im Biochem. J. Band 31, 645 wie folgt dar:

Wenn anaerobe Reaktionen, bei denen Brenztraubensäure umgewandelt wird, die einzigen wären, müßte man erwarten, daß der Grad der Abnahme der Brenztraubensäure unabhängig wäre von der Anwesenheit des Sauerstoffs. In einigen Geweben, wie z. B. Hirn und

in Testis ist der Einfluß von Sauerstoff auf den Verbrauch von Brenztraubensäure tatsächlich sehr gering, und es kann dabei sein, daß in diesen Geweben die Oxydation von Brenztraubensäure in erster Linie ein anaerober Prozeß ist. In einigen anderen Geweben jedoch, besonders in der Niere ist der Unterschied zwischen anaerobem und aerobem Anteil an der Umwandlung von Brenztraubensäure beträchtlich und die anaeroben Dismutationen können keineswegs für den ganzen Brenztraubensäureabbau verantwortlich gemacht werden.

Die Reaktion

$$\left.\begin{matrix} CH_3 \cdot CO \cdot COOH \\ CH_3 \cdot CO \cdot COOH \end{matrix}\right\} \begin{matrix} +2\,H \\ +O \end{matrix} \longrightarrow \begin{matrix} CH_3 \cdot CHOH \cdot CHOH \\ CH_3 \cdot COOH + CO_2 \end{matrix}$$

stellt einen Vorgang dar, bei welchem Kohlendioxyd als eines der Endprodukte der Atmung gebildet wird, und es ist von Interesse die Frage zu erörtern, welcher Teil der gesamten Atmungs-CO_2 aus dieser Reaktion entstanden ist. Der Höchstbetrag von Kohlendioxyd, gebildet aus der anaeroben Veränderung, beläuft sich auf ca. 60 bis 80% des bei der Atmung gebildeten Kohlendioxyds. In manchen Geweben, z. B. in der Niere ist es weniger, ca. 20—60%. Es ist jedoch noch nicht geklärt, durch welchen Prozeß der Rest des Atmungs-CO_2 gebildet wird. Die Decarboxylierung von Oxalessigsäure ist auch anders möglich, jedoch kann ihre quantitative Bedeutung noch nicht abgeschätzt werden.[11] [12] [13]

Die Oxysäuren, die sich aus der Dismutation der Bernsteinsäure ergeben, das sind die Milchsäure, l-Aepfelsäure und β-Oxybuttersäure, können in Geweben durch einen spez. Vorgang reoxydiert werden, bei welchem das oxydierende Agens möglicherweise molekularer Sauerstoff ist. Die durch die Reoxydation gebildete Ketosäure kann folglich ein anderes Molekül Ketosäure oxydieren und auf diesem Wege können Ketosäuren als Sauerstoffträger wirken.

Die von *Skent-Györgyi*[14] schon früher erwähnte Vermutung, daß in den Geweben eine Ketosäure, nämlich Oxalessigsäure den Sauerstoffträger darstellt, konnte in der Arbeit dieser beiden Forscher *(Krebs* und *Jonson)* für den Fall einer Oxydation einer α-Ketosäure bestätigt werden.

Krebs und *Jonson*[15] konnten ferner den Beweis führen, daß Ketonkörper als intermediäre Zwischenprodukte im Kohlehydratabbau tatsächlich auftreten. In Bezug damit ist es von Interesse zu betonen, daß als Folgeerscheinung dessen die Mehrzahl der Gewebe, obgleich unfähig Buttersäure und höhere Fettsäuren zu oxydieren, leicht

β-Oxybuttersäure oxydieren. Trotzdem konnte über die Natur dieser intermediären Sauerstoffträger keine völlige Klarheit beschafft werden.

Was die Rolle der Vitamine B_1 bei der Oxydation von Brenztraubensäure in Taubenhirn anlangt, auf die *Peters*[16]) 1936 hingewiesen hat, demzufolge die Anwesenheit von Vitamin B_1 nötig ist, konnten *Krebs* und *Jonson* mit rohem Vitamin B_1 bestätigen. Mit reinem kristallisiertem Vitamin schlugen die Versuche jedoch fehl.

Ihre Versuchsergebnisse können kurz folgendermaßen zusammengefaßt werden:

Brenztraubensäure wird unter anaeroben Bedingungen im tierischen Gewebe metabolisiert. Als Endprodukte des anaeroben Metabolismus von Brenztraubensäure wurden folgende Substanzen gefunden: Milchsäure, Essigsäure, CO_2, Bernsteinsäure und β-Oxybuttersäure. Der Beweis für die ersten vier Substanzen kann als endgültig betrachtet werden, der Beweis für die Bildung der β-Oxybuttersäure wurde mit Hilfe der *van Slyke-Deniges*-Quecksilbersulfatreaktion gegeben.

Die Mengen der gebildeten Produkte führen zur Anschauung, daß die primäre Reaktion eine Reaktion nach dem Schema III ist. Diese Reaktion stellt die Hauptanaerobereaktion von Brenztraubensäure in Testis und Hirn dar.

Die aus den Reaktionen mit anderen Geweben, besonders im Muskel, erhaltenen Resultate führen zur Anschauung, daß Essigsäure durch sekundäre Reaktionen verschwindet, in denen β-Oxybuttersäure das Hauptendprodukt ist, gemäß folgendem Schema:

$$CH_3 \cdot COOH + CH_3 \cdot CO \cdot COOH \longrightarrow CH_3 \cdot CHOH \cdot CH_2 \cdot COOH + CO_2$$

Der Beweis für den Ablauf zu III. analogen Reaktionen, in welchen α-Ketoglutarsäure und Oxalessigsäure teilnehmen, wurde gegeben.

Reaktionsverlauf:

1. $CH_3 \cdot CO \cdot COOH + CH_3 \cdot CO \cdot CH_2 \cdot COOH \longrightarrow CH_3 \cdot COOH + CO_2 +$ $+ CH_3 \cdot CHOH \cdot CH_2 \cdot COOH$

   Azetessigsäure — β-Oxybuttersäure

2. $CH_3 \cdot CO \cdot CH_2 + \begin{matrix} COOH \\ | \\ CO \\ | \\ CH_2 \\ | \\ CO \\ | \\ COOH \end{matrix} + H_2O \longrightarrow CH_3 \cdot COOH + CO_2 + \begin{matrix} COOH \\ | \\ CHOH \\ | \\ CH_2 \\ | \\ COOH \end{matrix}$

   Oxalessigsäure — Aepfelsäure

3. $\begin{matrix} COOH \\ | \\ CO \\ | \\ CH_2 \\ | \\ CH_2 \\ | \\ COOH \end{matrix} + CH_3 \cdot CO \cdot CH_2 \cdot COOH + H_2O \longrightarrow$

$\longrightarrow$ $\begin{matrix} COOH \\ | \\ CH_2 \\ | \\ CH_2 \\ | \\ COOH \\ \text{Bernsteinsäure} \end{matrix} + CO_2 + \underbrace{CH_3 \cdot CHOH \cdot CH_2 \cdot COOH}_{\beta\text{-Oxybuttersäure}}$

α-Ketoglutarsäure + Azetessigsäure + H_2O ⟶ Bernsteinsäure + CO_2 + β-Oxybuttersäure.

Schließlich wurde auch hier der Beweis erbracht,[17]) daß Ketonkörper nicht nur als intermediäre Zwischenprodukte im Fett- und Eiweißstoffwechsel, sondern auch im Kohlehydratstoffwechsel auftreten können.

An dieser Stelle möchte ich meinem hochverehrten Lehrer und Referenten Herrn Professor *A. Hahn* meinen herzlichsten Dank aussprechen.

Literaturverzeichnis

[1]) *Willstätter* und *Rhodewald* 7. physiolog. Chemie **247**, 115, 269 (1929).
[2]) *C.* und *G. Gori*, Proc. experim. Biolog. **34**, 702 (1936).
[3]) *Embden, Deutike, Jost*, Klin. Wschr. **12**, 213 (1932).
[4]) *Embden, Deutike, Jost*, Klin. Wschr. **12**, 213 (1932).
[5]) *Dische*, Naturwiss. **22**, 855 (1934).
[6]) *Krebs*, Nature **138**, 288 (1936).
[7]) *Knoop* und *Martins* 1936.
[8]) *Krebs* und *Jonson*, Biochem. J. **31**, 645, 772 (1937).
[9]) *Brensch*, Biochem. J. **295**, 125 (1938).
[10]) *Skent-Györgyi*, Z. physiolog. Chemie **244**, 105 (1936) — **224**, 1 (1934) — **236**, 1 (1935).
[11]) *Mendel, Strelitz* und *Bauch*, Klin. Wschr. **10**, 118 (1931).
[12]) *Rosenthal*, Biochem. Z. **244**, 133.
[13]) *Meyerhof* und *Kießling*, Biochem. Z. **283**, 83 (1935).
[14]) *Skent-Györgyi*, Hoppe-Seyl-Z. **236**, 1 (1935).
— Hoppe-Seyl-Z. **244**, 105 (1936).
— und *Gözsy*, Hoppe-Seyl-Z. **236**, 54 (1935).
— und *Straub*, Hoppe-Seyl-Z. **244**, 140 (1936).
[15]) *Krebs* und *Jonson*, Biochem. J. **31**, 645 (1937).
[16]) *Peters* Lancet, i, 1161 (1936).
[17]) *Jowett* und *Quastel*, Biochem. J. **29**, 2159, 2181 (1935).

Lebenslauf

Ich bin am 8. Juni 1916 in Kufstein als Sohn des Hugo und der Frieda Miller, geb. Müller geboren. Besuchte dort vier Klassen Volksschule und trat dann in das Realgymnasium ein, das ich 1934 absolvierte.

Im Jahre 1936 zog ich auf die Universität München, um dort Zahnheilkunde zu studieren.

1937 machte ich das Physikum und im Herbst 1939 das Staatsexamen.